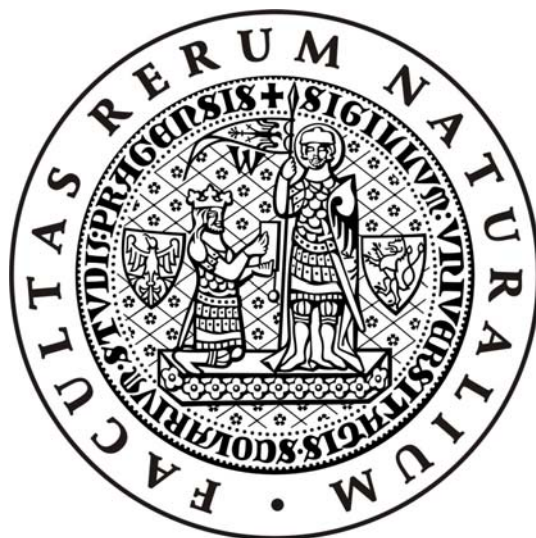


Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



Anaerobní mitochondriální organely exkavát

Anaerobic mitochondrion-like organelles of Excavata

Vojtěch Vacek

Bakalářská práce

Praha, letní semestr 2009

Školitel: Mgr. Vladimír Hampl, PhD

Poděkování

Rád bych poděkoval především Mgr. Vladimíru Hamplovi, PhD za jeho pomoc a vedení při tvorbě této bakalářské práce. Dále pak děkuji všem, co mě podporovali v průběhu mého studia.

Obsah

Obsah.....	1
Abstrakt	2
Úvod	3
Společný původ mitochondrie, hydrogenosomů a mitosomů	4
Metamonada	6
Diplomonády	7
Oxymonády	8
<i>Trimastix</i>	9
Parabasala.....	9
Heterolobosea.....	11
Euglenozoa	13
Jakobida.....	14
Závěr.....	15
Reference.....	16

Abstrakt:

Protista řazená mezi exkaváta jsou až na několik výjimek málo studované organismy a informací o nich, respektive o jejich mitochondriálních organelách, je velmi málo. Mitochondriální organely exkavát lze rozdělit do několika skupin: (a) klasické aerobní mitochondrie, (b) fakultativně anaerobní mitochondrie (některé eugleny), (c) hydrogenosomy (parabasala) (d) mitosomy (*Giardia intestinalis*) a (e) mitochondriální organely nejasného zařazení. Do poslední skupiny spadá většina anaerobních derivátů mitochondrií u exkavát. Část těchto mitochondriálních organel je na základě morfologické podobnosti označována jako hydrogenosomy, i když pro to chybí biochemické důkazy. Všechny vyšší skupiny říše Excavata snad s jedinou výjimkou, kterou jsou oxymonády, obsahují alespoň jednoho zástupce, u kterého byla mitochondrie nebo její anaerobní derivát pozorován v elektronovém mikroskopu. V některých případech byly také nalezeny proteiny, které jsou na tyto organely vázány (IscS, IscU, cpn60 etc.). V současné době většina autorů předpokládá, že všechny tyto organely společně s podobnými organelami ostatních eukaryot pocházejí ze společného předka, kterým byla α -proteobakterie.

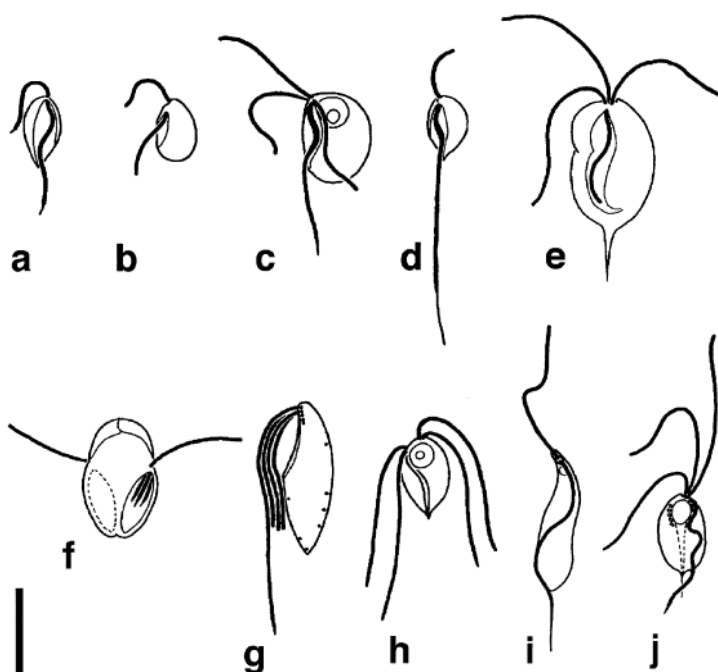
Almost all protists embedded in group excavata are poorly studied. We have little information about themselves and about their mitochondrion-like organelles. Mitochondrion-like organelles of Excavata could be resolved into several categories: (a) classical mitochondria, (b) facultatively anaerobic mitochondria (some euglenids) (c) hydrogenosomes (parabasalids) (d) mitosomes of *Giardia intestinalis* (e) other mitochondrion-like organelles. Majority of mitochondrion-like organelles of excavates belongs into the last category. Some of these mitochondrion-like organelles are designated (according to their morphological similarity) as hydrogenosomes, however there is lack of biochemical evidence for it. All higher taxa represented in the supergroup Excavata (perhaps with a single exception of oxymonads) possess at least one member, in which some kind of mitochondrion or mitochondrion-like organelle was observed in the electron microscope and some cases proteins associated with these organelles (like IscU, IscS, cpn60 etc.) were detected. Currently almost all authors consider these organelles (together with similar organelles of other eukaryotes) as descendants of a single common ancestor derived from α -proteobacterium.

Klíčová slova: exkaváta, hydrogenosom, mitosom, anaerobní, mitochondrie,

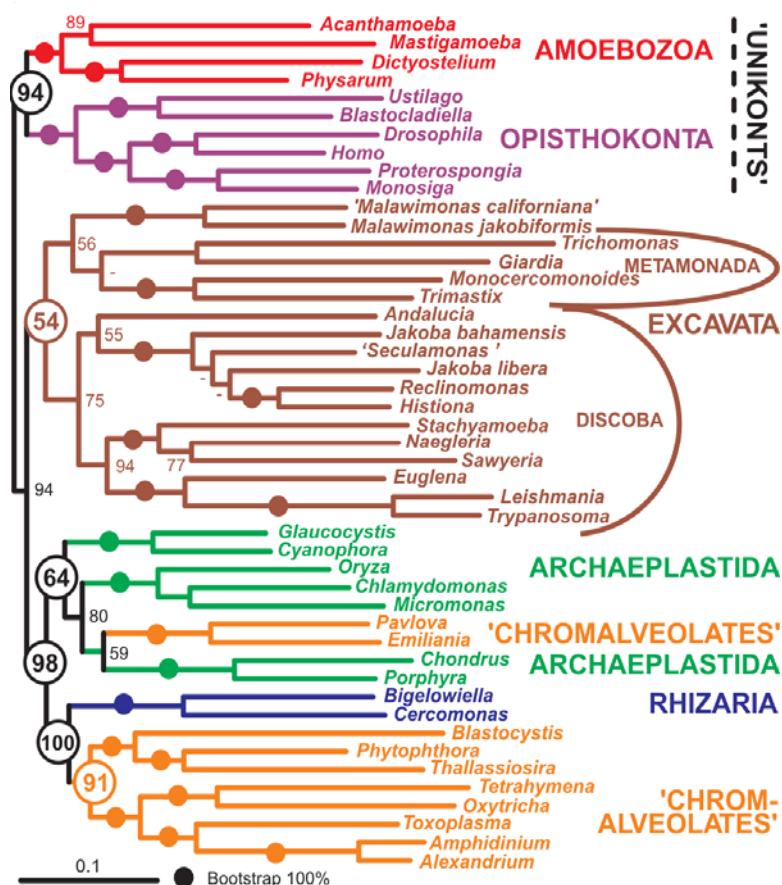
Key words: Excavates, hydrogenosome, mitosome, anaerobic, mitochondrion

Úvod

Říše Excavata se v současné době skládá z následujících skupin protist: jakobidů, heteroloboseí, oxymonád, euglenozoi, retortamonád, diplomonád, parabasalidů a rodů *Trimastix*, *Carpediemonas*, *Malawimonas* a *Dysnectes* (Obr.1). Typická exkaváta (Jakobida, retortamády, *Trimastix*, *Malawimonas*, *Carpediemonas* a *Dysnectes*) mají společné ultrastrukturní rysy: břišní rýhu a typické uspořádání flagelárního aparátu (Simpson and Patterson 1999, Simpson 2003). Vzhledem k tomu, že výše uvedené znaky jsou natolik unikátní a komplexní je nepravděpodobné, že by se mohly vyvinout vícekrát nezávisle na sobě, lze tedy oprávněně předpokládat, že se typická exkaváta vyvinula ze společného exkavátního předka (Simpson and Patterson 1999). Ostatní taxa řazená mezi exkaváta (heterolobosea, oxymonády, euglenozoa, diplomonády a parabasala) mají pouze některé exkavátní znaky nebo dokonce žádné morfologické exkavátní znaky nenesou. Pomocí molekulární fylogenetiky se však podařilo dokázat, že jsou příbuzná některým z typických exkavát, takže i tyto organismy zřejmě pochází z exkavátního předka (Dacks et al. 2001, Henze et al. 2001, Silberman et al. 2002, Simpson et al. 2002, Nikolaev et al. 2004). Jednotliví znak nebo fylogenetická studie, která by jednoznačně prokázala monofýlii všech zástupců říše



Obr.1: Schématické znázornění zástupců skupin říše Excavata: (a) Jakobida: *Jakobina incarcerationata*; (b) *Malawimonas*: *Malawimonas jakobiformis*; (c) *Trimastix*: *Trimastix pyriformis*; (d) *Carpediemonas*: *Carpediemonas membranifera*; (e) retortamonáda: *Chilomastix cuspidata*; (f) diplomonáda: *Trepomonas agilis*; (g) heterolobosea: *Percolomonas descissus*; (h) oxymonády: *Monocercomonoides hausmanni*; (i) Parabasalida: *Pseudotrichomonas keilini*; (j) Euglenozoa: *Dimastigella trypaniformis*. Měřítka: 10 μ m (převzato z Simpson 2003).



Obr.2: strom fylogenetických vztahů mezi eukaryoty vytvořený na základě analýzy 143 genů po vyloučení nejrychleji mutujících genů pro jednotlivé taxony. Čísla na uzlech udávají hodnotu bootstrapu (převzato z Hampl et al. 2009)

Excavata dosud nebyla publikována. Zatím nejpersvědčivějším důkazem je fylogenetická studie založená na 143 genech (Hampl et al. 2009).

Exkaváta tvoří velmi různorodou skupinu, ve které se vyskytují různé životní strategie – např. bakteriovorie, parazitizmus a fotosyntéza – a najdeme zde rovněž velké množství organismů žijících v anaerobních podmínkách, u kterých se vyvinuly různé anaerobní deriváty mitochondrií. V tomto textu se pokusím shrnout informace o těchto organelách.

Společný původ mitochondrií, hydrogenosomů a mitosomů

Mitochondrie se od hydrogenosomu a mitosomu v některých rysech liší, zatímco v jiných vlastnostech jsou si tyto organely podobné. Mezi nejvýznamnější rozdíly patří absence genomu u hydrogenosomů a mitosomů (s jedinou výjimkou, kterou je hydrogenosom u nálevníka *Nyctotherus ovalis*). Organely od sebe odlišuje i jejich metabolická funkce: hydrogenosom je organela produkující ATP, koncovým příjemcem elektronu je zde proton, jehož redukcí vzniká molekulární vodík. Na rozdíl od mitochondrií, kde je konečným akceptorem elektronů kyslík a finálním produktem je voda. V hydrogenosomu nejsou

lokalizovány některé metabolické dráhy typické pro mitochondrie jako například: pyruvát dehydrogenázový komplex, cyklus trikarboxylových kyselin, cytochrom elektronový transportní řetězec a F_1F_0 -ATPáza. Mitosom se od mitochondrií a hydrogenosomů ještě dále odlišuje především tím, že v něm není lokalizována syntéza ATP a jedinou prokázanou funkcí mitosomu je tvorba FeS center (Sutak et al. 2004).

Společnými vlastnostmi mitochondrií, hydrogenosomů a mitosomů je dvojitá membrána, která je obklopuje. Výskyt mitochondriálních heat-shock proteinů Hsp70, Hsp60 a Hsp10 (Bui et al. 1996) a přítomnost enzymů pro tvorbu FeS center (Tachezy et al. 2001, Sutak et al. 2004, Dolezal et al. 2007). Hlavní hydrogenosomální protein pro tvorbu FeS center – cystein desulfuráza (IscS), je fylogeneticky příbuzný s jeho mitochondriálním homologem. To je důkazem podobnosti mechanismu tvorby FeS center v mitochondriích a hydrogenosomech (Tachezy et al. 2001, Sutak et al. 2004). Frataxin je mitochondriální protein účastnící se tvorby FeS center a hemu v mitochondriích. Tento vysoce konzervovaný protein byl nalezen také u *Trichomonas vaginalis*. Pomocí imunofluorescenční mikroskopie bylo zjištěno, že frataxin je u *Trichomonas vaginalis* lokalizován v hydrogenosomech (Dolezal et al. 2007). *In vitro* je tento protein schopen funkčně nahradit svůj homolog v kvasinkách *S. cerevisiae*. Tvorba, maturace a export FeS center je považována za možnou základní funkci všech mitochondriálních organel (Sutak et al. 2004).

Membrány hydrogenosomů *Trichomonas vaginalis* obsahují cardiolipin, fosfolipid, který se u eukaryot vyskytuje pouze v mitochondriích (De Andrade Rosa et al. 2006). Hydrogenosomy a mitochondrie také mají stejné mechanismy dělení: (a) segmentací – protažené hydrogenosomy jsou rozděleny vnějšími membránovými profily, (b) přehrazením, kdy jsou hydrogenosomy v kruhové formě rozděleny vnitřním membránovým septem a (c) srdcovitou formou (heart-shape), při které jsou hydrogenosomy rozděleny postupnou invaginací membrány. Obě organely se mohou dělit v kterékoliv fázi buněčného cyklu (Benchimol and Engelke 2003).

U hydrogenosomů i mitosomů byly nalezeny mitochondriální mechanismy transportu proteinů. Společný mechanismus transportu proteinů byl prokázán na proteinu Hmp31, který se nachází na vnitřní membráně hydrogenosomu trichomonád a je fylogeneticky příbuzný s mitochondriálními ADP/ATP přenašeči (AAC) (Dyall et al. 2000). Studie provedená na Hmp31 u *Trichomonas gallinae* (Tjaden et al. 2004) ukázala, že tento protein je biochemicky odlišný od ostatních dosud studovaných AAC u mitochondrií a hydrogenosomů. Zásadní odlišností je především rezistence vůči BKA (bongkrek acid), která inhibuje ostatní AAC. Na základě fylogenetické analýzy není zřejmé, zda je Hmp31 trichomonád ortologní k ACC

mitochondriálního typu, nebo zda se jedná o paralog, který se vyvinul z jiného člena MCF (mitochondrial carrier family). Stejný mechanismus transportu byl prokázán u proteinů pro tvorbu FeS center (Dolezal et al. 2005). Stejná studie zároveň dokazuje přítomnost některých komponent komplexů pro transport přes mitochondriální membrány (komplexy TOM a TIM) v hydrogenosomech a mitosomech (Dolezal et al. 2005).

Vzhledem k výše uvedeným podobnostem jsou v současné době hydrogenosomy a mitosomy většinou autorů považovány za biochemicky modifikované deriváty mitochondrií, a za jejich společného předka je považována α -proteobakterie (souhrnný článek např. Embley 2006).

V následující části se pokusím shrnout známé informace o anaerobních derivátech mitochondrií v jednotlivých skupinách organismů řazených do exkavát. Většinou se jedná o poměrně málo studované organismy. Často jediné informace o možných mitochondriálních organelách pocházejí z elektronmikroskopických studií a většinou o nich chybí biochemické informace.

Metamonada

Skupina bičíkatých protist zcela postrádajících aerobní mitochondrii. Metamonada *sensu* Cavalier-Smith (2003) zahrnují: retortamonády, diplomonády, *Trimastix*, *Carpediemonas*, *Dysnectes*, parabasalidy a oxymonády. Většinou se jedná o endobionty, některé druhy jsou ale volně žijící. S výjimkou parabasalidů a diplomonád, mezi které patří významní patogeni člověka a zvířat, se jedná o poměrně málo studované organismy. *Carpediemonas*, *Dysnectes* a retortamonády jsou příbuzné diplomonádám a společně se označují jako Fornicata (Silberman et al. 2002, Simpson 2003, Yubuki et al. 2007). Je možné, že metamonády tvoří monofyletickou skupinu. Pro potvrzení tohoto předpokladu je potřeba dalších studií (Cavalier-Smith 2003, Hampl et al. 2009). Pokud by se prokázalo že se jedná o monofyletickou skupinu, bylo by pak pravděpodobné, že k přechodu na anaerobní způsob života došlo již u jejich společného předka.

Retortamonády

Retortamonády jsou svou morfologickou stavbou podobné mitochondriálním jakobidům a *Malawimonas* s anaerobní mitochondrií (O'Kelly 1993). Podle analýzy SSU rRNA tvoří dosud sekvenované retortamonády dvě parafyletické větve (*Retortamonas* a *Chilomastix*) příbuzné diplomonádám (Čepička et al. 2008).

U retortamonády *Chilomastix cuspidata* byla nalezena zhruba 500 nm dlouhá elektron denzní organela (Obr.4 snímek B) pravděpodobně obklopená dvěma membránami (Weerakoon et al. 1999). U *Retortamonas* sp. byly také objeveny geny pro [FeFe] hydrogenázu, jeden z klíčových enzymů metabolismu pyruvátu v hydrogenosomech. [FeFe] hydrogenáza se však vyskytuje u některých eukaryot také volně v cytosolu. Z tohoto důvodu nemůže být přítomnost tohoto enzymu považována za důkaz existence mitochondriální organely u *Retortamonas* sp. (Hampl and Simpson 2008, Hampl et al. 2008).

Carpediemonas membranifera, žijící v sedimentech chudých na kyslík, má úzké a protáhlé, přibližně 450 nm dlouhé organely, které jsou obklopeny dvojitou membránou (Obr.4 snímek D). Tyto organely jsou umístěny posteriorně k jádru. Funkce těchto organel není známa, ale strukturně připomínají hydrogenosom (Simpson and Patterson 1999). Fylogenetická studie SSU RNA prokázala, že *Carpediemonas* je nejbližší známý příbuzný retortamonádám a diplomonádám (Silberman et al 2002). Oproti nim má *Carpediemonas* plně vyvinutý endomembránový systém a Golgiho aparát, které u retortamonád a diplomonád chybí.

Také u dalšího blízkého příbuzného retortamonádám a *Carpediemonas*, volně žijícího *Dysnectes brevis*, byly nalezeny organely, které mohou být považovány za anaerobní derivát mitochondrií. Tyto organely jsou oválného tvaru a jsou naplněné denzní matrix (Obr.4 snímek N). V průměru mají přibližně 350 nm a nacházejí se v blízkosti jádra (Yubuki et al. 2007). Počet membrán nemohl být kvůli fixačním problémům určen, ale svým charakterem se organely podobají mitochondriálním organelám nalezeným u *Carpediemonas* a *Trimastix*.

Diplomonády

Diplomonády mají podobně jako retortamonády slabě vyvinutý endomembránový systém. To spolu s absencí mitochondrie vedlo k předpokladu, že se jedná o jedny z nejstarších eukaryot, které se od ostatních skupin oddělily ještě před získáním mitochondrie. Nálezy genů pro proteiny asociované s mitochondriemi jako hsp70, cpn60, IscS, IscU (Tachezy et al. 2001, Dolezal et al. 2005, Roger et al. 1998, Horner and Embley 2001, Andersson et al. 2007) a dalších však ukázaly, že diplomonády se pravděpodobně vyvinuly z předka, který měl mitochondrii nebo jí příbuznou organelu. Lokalizace těchto proteinů vedla k nálezu mitosomu u *Giardia intestinalis* (Tovar et al. 2003).

Mitosomy nalezené u *Giardia intestinalis* jsou malé dvoumembránové organely – obvykle menší než 0,2 μm - které jsou vyplněny granulární elektrondenzní matrix (Obr.4 snímky J a K). V buňkách se vyskytují v poměrně velkých počtech – 25 až 100. Většina

mitosomů je rozmístěna náhodně v cytoplazmě, avšak některé mitosomy tvoří zřetelnou tyčovitou strukturu mezi dvěma jádry giardií v těsné blízkosti bazálních tělískům. Popsaná struktura pravděpodobně hraje roli v biogenezi a rozdělování mitosomů do dceřiných buněk při dělení giardií (Regoes et al. 2005). Mitosomy giardie mají podobný mechanismus transportu proteinů jako mitochondrie a hydrogenosomy. N-terminální sekvence, podobná mitochondriální targetovací sekvenci, byla nalezena u proteinů IscU a ferredoxinu, tedy proteinů představujících klíčové homology proteinů pro tvorbu FeS center. U IscU, mtHsp70 a cnp60 nebyla nalezena N-terminální sekvence, přesto se podařilo ukázat, že sekvence těchto genů obsahuje pravděpodobně vnitřní signál dostatečný pro import jak do hydrogenosomů trichomonád, tak do mitochondrií kvasinek (Dolezal et al. 2005). Tvorba FeS center je pravděpodobně hlavní funkcí mitosomů *Giardia intestinalis*, protože mitosomy nejsou schopny syntetizovat ATP a zřejmě neobsahují ani jiné metabolické dráhy.

Elektronmikroskopická studie provedená na *Spironucleus vortens* (Sterud and Poyton 2002) odhalila elektrondenční organely o přibližné délce asi 400 nm (Obr.4 snímek O). Ty se nacházejí v blízkosti jádra a jsou pravděpodobně obaleny dvěma membránami. U diplomonády *Spironucleus salmonicida* (izolát ATCC50380 dříve označovaný jako *Spironucleus barkhanus*) byly pomocí EST sekvenování nalezeny geny pro proteiny asociované s mitochondriemi – cnp60, dynamin-like protein a cystein desulfuráza (IscS) (Horner and Embley 2001, Andersson et al. 2007). Nález těchto proteinů silně podporuje existenci nebo sekundární ztrátu mitochondriální organely u *Spironucleus salmonicida*.

Oxymonády

U oxymonády *Pyronympha* sp. izolované ze střeva termitů byly popsány velké denzní cytoplazmatické struktury (Bloodgood et al. 1974). Tyto podezřelé útvary ovšem nejsou většinou autorů považovány za mitochondrie ani hydrogenosomy, ale spíše za endosymbiotické bakterie. V případě oxymonády *Saccinobaculus doroaxostylus* izolované ze střeva švába však byly popsány elektrondenční organely, které by mohly být organelami mitochondriálního původu (Carpenter et al. 2007). Organely (Obr.4 snímek C) jsou zhruba kruhového tvaru, o průměru 0,5 – 1,5 μm a nemají žádnou zjevnou vnitřní strukturu. Počet membrán obklopujících organelu se dosud nepodařilo s jistotou prokázat, ale na některých snímcích v Carpenter et al. 2007 byly pozorovány 2 tmavší vrstvy oddělené světlejší vrstvou a na dalších snímcích byl pozorován pětivrstvý vzor podobný vzoru pozorovanému u hydrogenosomů parabasalidů. U oxymonády *Monocercomonoides* sp. byly pomocí EST

sekvenování nalezeny geny pro [FeFe] hydrogenázu a pyruvát ferredoxin oxidoreduktázu. Jejich buněčná lokalizace zatím není známa (Hampl and Simpson 2008).

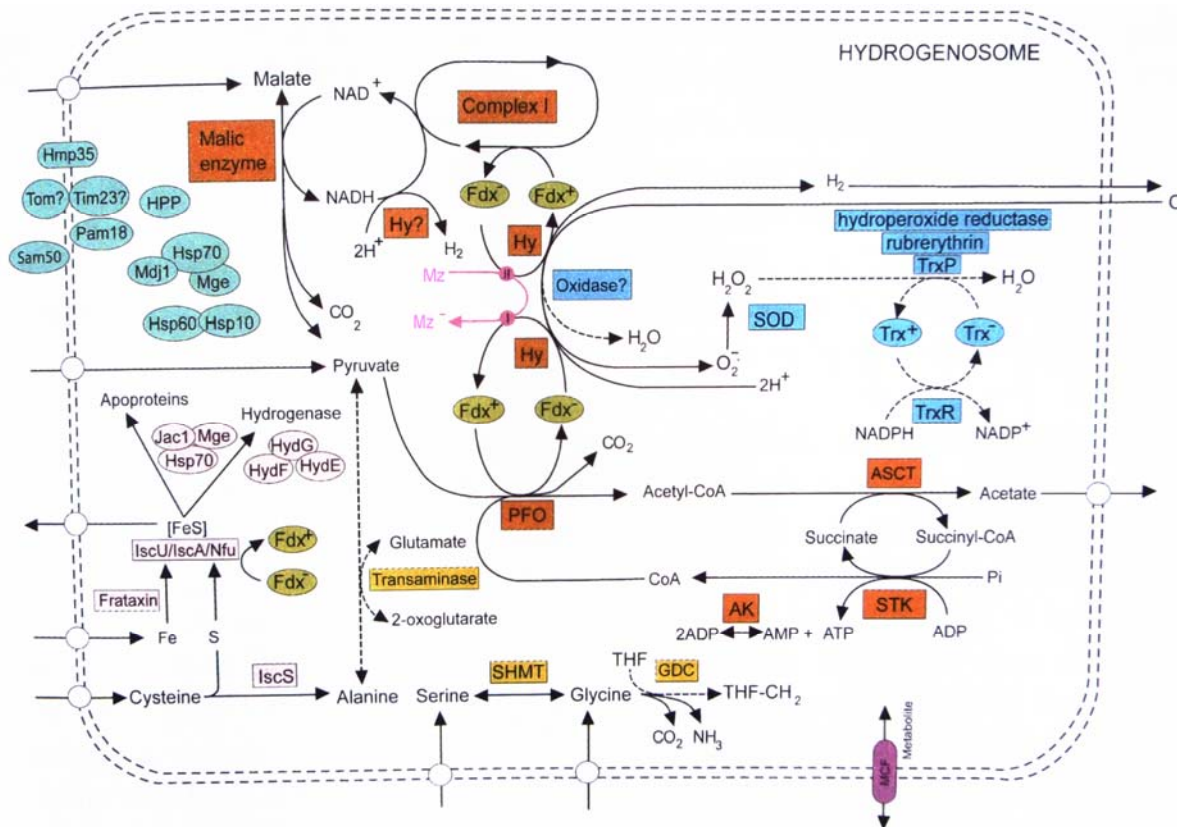
Trimastix

Trimastix tvoří samostatný taxon blízce příbuzný oxymonádám. Jsou to bičíkovci volně žijící v anoxických vodách. *Trimastix marina* má oválné dvoumembránové organely kruhovitého průřezu, které jsou přibližně 200 nm široké a 300 nm dlouhé. Strukturou připomínají hydrogenosom (Simpson et al. 2000). Tyto organely se nachází na různých místech buňky a na rozdíl od podobných organel, popsaných u *Trimastix pyriformis*, nejsou asociovány s cisternami endoplasmatického retikula, i když se často vyskytují v jeho blízkosti. U *Trimastix pyriformis* byly popsány 0,5 – 1,0 µm dlouhé tyčovité organely (Obr.4 snímek M) obklopené dvojitou membránou (O'Kelly et al. 1999). Pomocí EST sekvenování bylo u *Trimastix pyriformis* nalezeno 12 genů kódující proteiny asociované s mitochondriemi. Mimo jiné i enzym akonitáza, který je typický pro aerobní mitochondrie, kde tvoří součást cyklu trikarboxylových kyselin. Čtyři z těchto proteinů obsahovaly prodlouženou N-terminální sekvenci, která však nebyla v dostupných software rozpoznána jako mitochondriální targetovací sekvence. Přítomnost těchto genů naznačuje, že pozorované organely *Trimastix pyriformis* jsou homology mitochondrie (Hampl et al. 2008).

Parabasala

Parabasala jsou skupinou mikroaerofilních protist. Jedná se většinou o endobionty, ale najdou se mezi nimi i volně žijící zástupci. Společným znakem parabasalidů je parabasální aparát tvořený Golgiho komplexem zavěšeným na mikrofibrilárních strukturách (parabazálních fibrilách). Fylogeneticky tvoří parabasala sesterskou skupinu k fornikátům (Henze et al. 2001, Hampl et al. 2009). Všechna známá Parabasala mají hydrogenosom. Hydrogenosom u trichomonád je nejstudovanějším anaerobním derivátem mitochondrií.

Hydrogenosom je obvykle sférická nebo mírně protáhlá, někdy až „piškotovitá“ organela obklopená dvojitou membránou, mezi membránami obvykle není pozorován žádný volný prostor. Hydrogenosomy *Trichomonas vaginalis* dosahují za běžných podmínek rozměrů 200 nm až 500 nm (Obr.4 snímek L). Za určitých podmínek, jako je například vystavení účinkům metronidazolu, mohou hydrogenosomy nabývat velikosti až 2 µm. Hydrogenosomy jsou vyplněny granulární matrix (Benchimol 2009). U trichomonád mají několik periferních váčků, které slouží jako zásobárna vápníku. Hydrogenosomy se obvykle vyskytují v blízkosti endoplasmatického retikula, které jim patrně poskytuje nové membrány



Obr.3: Navrhovaná biochemická mapa hydrogenosomu (Hrdy et al. 2008). Přerušované čáry zobrazují předpokládané metabolické dráhy, které ještě nebyly potvrzeny. Prázdná kolečka představují dosud neidentifikované membránové přenašeče. Význam použitých zkratk: AK – adenylát kináza, ASCT – succinyl-CoA: acetát transferáza, Fdx – ferredoxin, GDC – glycin dekarboxyláza, Hy – [FeFe]hydrogenáza, Mz – metronidazol, PFO – pyruvát: ferredoxin oxidoreduktáza, SHMT – serin hydroxymethyl transferáza, SOD – superoxid dismutáza, STK – succinát thiokináza, TrxP – thioredoxin peroxidáza, TrxR – thioredoxin reduktáza.

pro růst a dělení. Hydrogenosom má podobný mechanismus transportu proteinů jako mitochondrie (Dyall et al 2000, Dolezal et al. 2005). V membráně hydrogenosomu *Trichomonas vaginalis* byl také nalezen cardiolipin (De Andrade Rosa et al 2006). V hydrogenosomech je lokalizována tvorba FeS center a jejich vkládání do FeS proteinů. Klíčovými proteiny jsou IscS a IscU, stejně tomu je i v mitochondriích. U *Trichomonas vaginalis* byl nalezen enzym NADH dehydrogenáza, který je součástí mitochondriálního komplexu I, známého také jako NADH:ubiquinon oxidoreduktáza. Tento komplex tvoří první část mitochondriálního dýchacího řetězce a katalyzuje přenos elektronů z NADH na ubiquinon. Pomocí imunofluorescence bylo dokázáno, že NADH dehydrogenáza je lokalizována v hydrogenosomech. Fylogenetická analýza prokázala, že tento enzym trichomonád má stejný původ jako jeho mitochondriální ekvivalent (Hrdy et al. 2004).

V hydrogenosomu trichomonád je lokalizován metabolismus pyruvátu (Obr. 3), který vzniká při glykolýze v cytosolu. Hydrogenosomy oxidují pyruvát nebo malát na acetát, CO₂ a molekulární vodík. Základními enzymy této metabolické dráhy jsou pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO) katalyzující oxidativní dekarboxylaci pyruvátu, [2Fe-2S]ferredoxin

sloužící jako přenašeč elektronů a [FeFe]hydrogenáza, která reoxiduje ferredoxin a redukuje protony na molekulární vodík. Všechny výše uvedené proteiny obsahují FeS centra (více informací o metabolismu hydrogenosomů např. Hrdy et al. 2008).

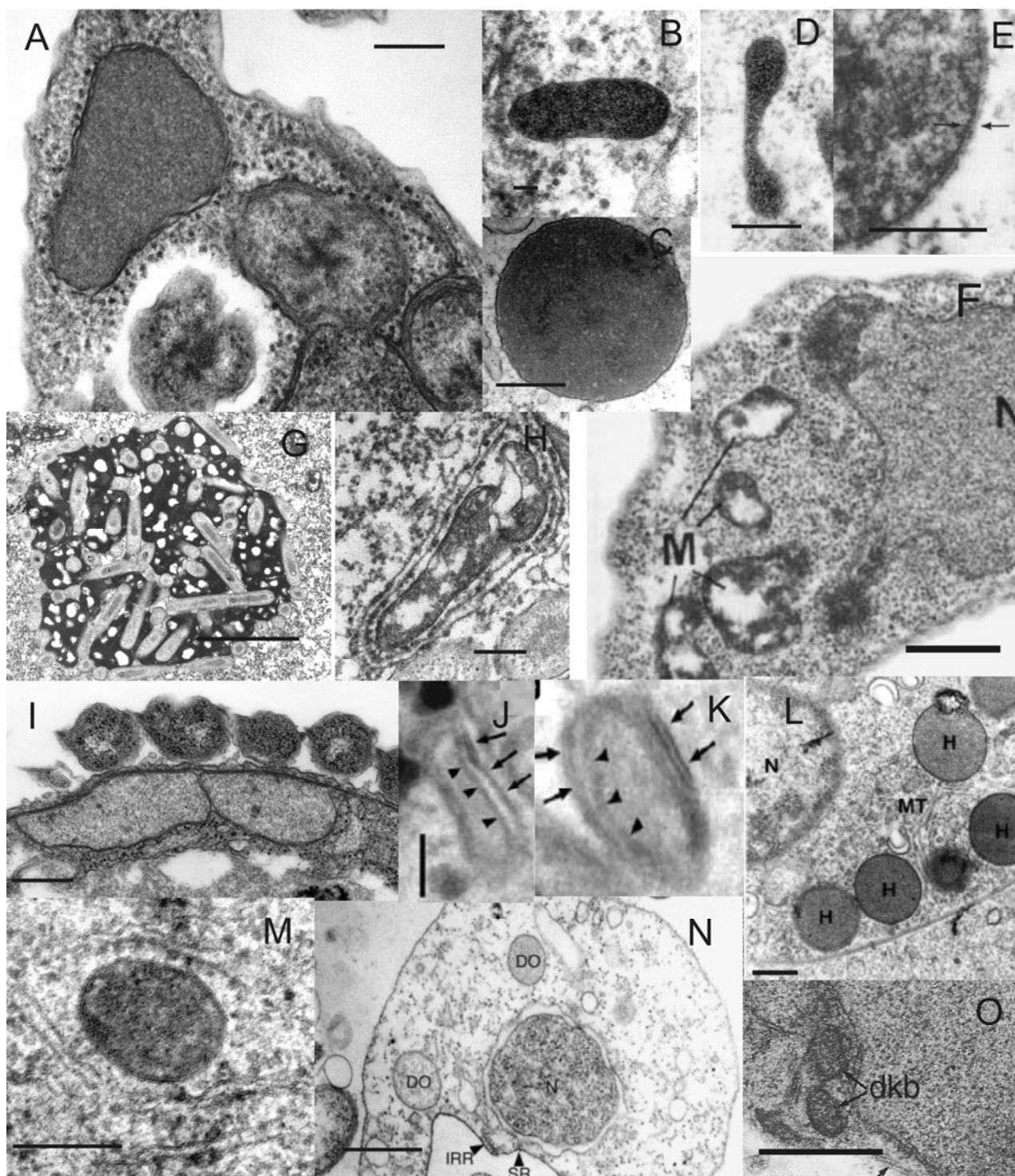
Heterolobosea

Většina heteroloboseí jsou volně žijící protista, která mají aerobní mitochondrie. Heterolobosea, která nemají aerobní mitochondrii, obsahují dvoumembránovou organelu označovanou jako hydrogenosom. Vzhledem ke skutečnosti, že chybí biochemická a fyziologická data o těchto organelách je otázkou, zda se skutečně jedná o hydrogenosomy.

Organely (Obr4. snímky G a H) u *Psalteriomonas lanterna* jsou ohraničeny dvojitou membránou a nemají žádné vnitřní struktury. Jsou poskládány do globulární struktury (Broers et al. 1990) spolu s methanogeními (H_2/CO_2 a formát využívajícími) bakteriemi (*Methanobacterium formicicum*). Tyto bakterie pravděpodobně využívají vodík produkovaný hydrogenosomy a tím zabraňují inhibici hydrogenosomálního metabolismu nahromaděním konečného produktu (Broers et al. 1992). Osamocené hydrogenosomy v periferních částech buňky jsou obklopeny cisternami endoplazmatického retikula. Z biochemického a fyziologického hlediska se o těchto organelách ví jen velmi málo. Jedinou informací o biochemii hydrogenosomů *Psalteriomonas lanterna* je nález ferredoxinu, který je podobný ferredoxinu *Trichomonas vaginalis* (Hackstein et al. 2001).

Podobné globulární struktury jako u *Psalteriomonas lanterna* byly nalezeny i u *Lyromonas vulgaris* (dříve nazývané *Psalteriomonas vulgaris*). Globulární útvary, popsané Broersem a kol. (1990), se nacházely posteriorně k jádru a byly tvořeny podlouhlými 1-3 μm dlouhými organelami a endosymbiotickými bakteriemi *Methanobacterium formicicum*. V těchto organelách byla nalezena [FeFe]hydrogenáza (Broers et al. 1993 převzato z Hampl and Simpson 2008). Oproti *Psalteriomonas lanterna* zde nebyla zjištěna asociace s endoplazmatickým retikulem.

Z mikraerobních mořských sedimentů izolovaný heterolobosean *Monopylocystis visvevarai* má kulovité až tyčovité organely, které jsou velké přibližně 300 nm. Organely jsou bez vnitřních krist a jsou vyplněny homogenní elektrondenzní matrix (O'Kelly et al. 2003). Strukturně podobné organely byly nalezeny i u *Sawyeria marylandensis*, kde byly popsány kulovité dvoumembránové organely s žíhanou elektrondenzní matrix (O'Kelly et al. 2003). Na základě strukturní podobnosti s hydrogenosomy u *Psalteriomonas lanterna* a *Lyromonas vulgaris* byly tyto mitochondriální organely u *Monopylocystis visvevarai* a *Sawyeria marylandensis* označeny jako hydrogenosomy. Biochemická data o těchto organelách



Obr.4: Snímky některých mitochondriálních organel z transmisního elektronového mikroskopu: **A** *Anadalucia incarcerationata* – měřítko 200 nm (převzato z Hampl and Simpson 2008), **B** *Chilomastix cuspidata* – měřítko 200 nm (převzato z Hampl and Simpson 2008), **C** *Saccinobaculus doroaxostylus* – měřítko 200 nm (převzato z Carpenter et al. 2007), **D** *Carpediemonas membranifera* (převzato z Simpson and Patterson 1999), **E** *Vahlkampfia anaerobica* detail dvojité membrány – měřítko 250 nm (převzato z Smirnov and Fenchel 1996), **F** *Percolomonas descissus* – organely jsou označeny jako M, měřítko 1 μ m (převzato z Simpson and Brugerolle 2004), **(G,H)** *Psalteriomonas lanterna* (převzato z Broers et al 1990) **G**- organely (tmavé) asociované do globule s endosymbionty (světlé) – měřítko 1 μ m, **H** osamocená organela obklopená membránami ER, **I** *Postgaardi mariagerensis* (převzato z Simpson et al. 1996), **J,K** – detaily mitosomů *Giardia intestinalis* – měřítko 50 nm (převzato z Tovar et al. 2003), **L** – hydrogenosomy (H) *Trichomonas vaginalis* (převzato z Benchimol 2009), **M** *Trimastix pyriformis* (převzato z Hampl and Simpson 2008), **N** *Dysnectes brevis* organely označeny DO – měřítko 1 μ m (převzato z Yubuki et al 2007), **O** *Spironucleus vortens* organely označeny dkb – měřítko 300 nm (převzato z Sterud and Poynton 2002). – měřítko 200 nm

v současné době nejsou k dispozici. *Sawyeria marylandensis* tvoří spolu s *Psalteriomonas lanterna* a *Monopylocystis visvesvarai* ve fylogenetických studiích dobře podpořenou skupinu (O'Kelly et al. 2003), což naznačuje, že k přechodu na anaerobní způsob života mohlo dojít již u jejich společného předka.

Dalším zástupcem heteroloboseí s anaerobní mitochondrií je *Vahlkampfia anaerobica*. Jedná se o amébu izolovanou z anaerobních mořských sedimentů, u které byly nalezeny kulovité až protáhlé dvoumembránové organely bez vnitřních krist a struktur (Obr.4 snímek E). Velikost těchto organel byla až 1,5 μm . Podobně jako u většiny anaerobních mitochondriálních organel heteroloboseí ani zde nebyla zjištěna asociace s endoplasmatickým retikulem (Smirnov and Fenchel 1996).

Dalším potencionálním nositelem anaerobní mitochondriální organely (Obr.4 snímek F) bez krist je *Percolomonas descissus* žijící v prostředích s nízkým obsahem kyslíku (Brugerolle and Simpson 2004). Obrázky této organely jsou bohužel nevalné kvality. *Percolomonas descissus* nebyla dále zkoumána, proto zůstává otázkou, zda se skutečně jedná o mitochondriální organelu. Fylogenetické postavení *Vahlkampfia anaerobica* a *Percolomonas descissus* není známo.

Samostatnou skupinu v rámci heteroloboseí tvoří *Pleurostomum flabellatum*, které je extrémně halofilní a často žije v podmínkách s nízkou koncentrací kyslíku. Pomocí elektronové mikroskopie u něj byla nalezena mitochondriální organela s kruhovým profilem a elektrondenční matrix, avšak bez vnitřních diskoidních krist, které jsou typické pro mitochondrie aerobních heteroloboseí. Tato mitochondrie obvykle není asociována s endoplasmatickým retikulem. Vzhledem k podmínkám, v nichž *Pleurostomum flabellatum* žije, je možné, že se jedná o hydrogenosom. Protože v současné době nejsou známa biochemická data a *Pleurostomum flabellatum* fylogeneticky nepatří ke skupině anaerobních a mikroaerofilních heteroloboseí, proto není možné rozhodnout, zda se jedná o mitochondrii či hydrogenosom (Park et al. 2007).

Euglenozoa

Euglenozoa jsou většinou volně žijící (výjimku tvoří především kinetoplastea) aerobní protista, která mají v typickém případě mitochondrie s diskovitými kristami. Mezi aerobní a mitochondriální euglenozoa nezapadá *Postgaardi mariagerensis* striktně anaerobní flagelát (nevyskytující se v mikrooxické nebo okysličené vodě), kterého poprvé z anoxické vody dánského fjordu izoloval Fenchel et al (1995). Pomocí TEM u něj byly pod elektrondenční

vrstvou, nacházející se na povrchu buňky, nalezeny rozvětvené organely (Obr.4 snímek I) tubulárního charakteru (Simpson et al. 1996). Tyto organely se nacházejí poblíž epibiotických bakterií a jsou obklopeny dvojitou membránou. Vnitřek dvoumembránových organel je vyplněn homogenní matrix, která je světlejší než okolní cytoplasma. V organelách nebyly pozorovány krysty ani jádro nebo jiné struktury. Téměř celý povrch *Postgaardi mariagerensis* je pokryt epibiotickými tyčinkovitými bakteriemi.

Rovněž nedávno objevená *Calkinsia aureus* (Yubuki et al. 2009), která byla izolována z mikroaerofilní vody mořského dna (z hloubky 580 - 592 m), obsahuje organely s dvojitou membránou a bez vnitřních krist. Organely, morfologicky nápadně připomínající hydrogenosomy (velikost přibližně 1 - 1,5 μm), tvoří těsně pod povrchovými mikrotubuly téměř souvislou vrstvu. Tyto zřejmě mitochondriální organely se nezdají být asociovány s epibiotickými bakteriemi, což je odlišuje od podobných organel nalezených u *Postgaardi mariagerensis*. O organelách zatím chybí biochemické informace, proto nelze s jistotou říci, zda se jedná o hydrogenosomy.

U některých euglenozoi, jako je například *Euglena gracilis* byly, nalezeny fakultativně anaerobní mitochondrie schopné produkovat ATP i za anaerobních podmínek. Tato schopnost je u mitochondrií *Euglena gracilis* umožněna přítomností enzymu NADP⁺ oxidoreduktázy (PNO). Enzym PNO pravděpodobně vznikl spojením dvou genů: genu pro PFO a genu pro NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktázu (CPR). PNO nalezená u *Euglena gracilis* je příbuzná s PNO u *Cryptosporidium parvum* (nepříbuzného prvoka z rodu apikomplexa). PNO *Cryptosporidium parvum* neobsahuje mitochondriální targetovací sekvenci, která je přítomna u PNO *Euglena gracilis*. Je pravděpodobné že PFO domény tohoto proteinu pocházejí od společného předka mitochondrie a hydrogenosomu α -proteobakterie (Rotte et al. 2001).

Jakobida

Skupinu jakobida tvoří malí volně žijící heterotrofní bičíkovci. Všichni známí zástupci jakobidů jsou aerobové a mají mitochondrii s jedinou výjimkou, kterou je *Andalucia incarcerata*. *Andalucia incarcerata* původně pojmenovaná *Jakoba incarcerata* byla na základě morfologické podobnosti původně zařazena do rodu *Jakoba*. Na základě fylogenetické studie její 18S rRNA byla přeřazena společně s aerobním druhem *Andalucia godoyi* do rodu *Andalucia* (Lara et al. 2006). U *Andalucia incarcerata* kultivované v anaerobních podmínkách byly nalezeny protáhlé organely (Obr.4 snímek A), které mají průřez 300-500 nm a jsou vyplněné matrix střední denzity. Ve vnitřní matrix těchto

mitochondrií nebyly nalezeny kristy ani jiné vnitřní členění (Simpson and Patterson 2001). *Andalucia godoyi*, nejbližší příbuzný *A. incarcerata*, má jednu mitochondrii s tubulárními kristami.

Závěr

Exkavátní protista mají celou škálu mitochondriálních organel od klasické aerobní mitochondrie s kristami až po mitosomy. Většina anaerobních organel exkavát, s výjimkou hydrogenosomů trichomonád a mitosomů giardií, je poměrně málo studována, proto téměř všechny tyto organely zatím čekají na důkladnější poznání. Biochemické a proteomické studie těchto organel by mohly říci mnohé o jejich funkcích a o možnostech přizpůsobení se k anaerobnímu způsobu života. Tyto informace by mohly pomoci dokázat nebo vyvrátit exkaváta jako monofyletickou skupinu a možná by mohly odpovědět na některé otázky týkající se vzniku eukaryotické buňky.

Reference:

- Andersson JO, Sjögren AM, Horner DS, Murphy CA, Dyal PL, Svärd SG, Logsdon JM Jr, Ragan MA, Hirt RP, Roger AJ. (2007) A genomic survey of the fish parasite *Spiroplasma salmonicida* indicates genomic plasticity among diplomonads and significant lateral gene transfer in eukaryote genome evolution. *BMC Genomics* 2007, 8:51
- Benchimol M. (2009) Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell*. 2009 Mar 16
- Benchimol M, Engelke F (2003). Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Trichomonas foetus*. *Biology of the Cell* 95 (2003) 283–293
- Bloodgood RA, Miller KR, Fitzharris TP, McIntosh JR (1974) The ultrastructure of *Pyronympha* and its associated symbionts. *J Morphol* 143:77-105
- Broers CAM, Stumm CK, Vogels GD (1992) Monoxenic cultivation of the anaerobic ameboflagellate *Psalteriomonas lanterna* and isolation of the methanogenic endosymbiont. *FEMS Microbiol Lett* 92:115-118
- Broers CAM, Stumm CK, Vogels GD and Brugerolle G (1990) *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., sp. nov., a free-living ameboflagellate isolated from fresh-water anaerobic sediments. *Eur. J. Protistol.* 25: 369–380.
- Brugerolle G, Simpson AGB (2004) The Flagellar Apparatus of Heteroloboseans. *J Eukaryot Microbiol.* 2004 Jan-Feb;51(1):96-107
- Bui ET, Bradley PJ, Johnson PJ. (1996) A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9651-6.
- Carpenter KJ, Waller RF, Keeling PJ. (2007) Surface morphology of *Saccinobaculus* (Oxymonadida): implications for character evolution and function in oxymonads. *Protist*. 2008 Apr;159(2):209-21
- Cavalier-Smith T. (2003) The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalida, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003 Nov;53(Pt 6):1741-58.
- Cepicka I, Kostka M, Uzlíková M, Kulda J, Flegr J. (2008) Non-monophyly of Retortamonadida and high genetic diversity of the genus *Chilomastix* suggested by analysis of SSU rDNA. *Mol Phylogenet Evol*. 2008 Aug;48(2):770-5.
- Dacks JB, Silberman JD, Simpson AG, Moriya S, Kudo T, Ohkuma M, Redfield RJ. (2001) Oxymonads are closely related to the excavate taxon Trimastix. *Mol Biol Evol*. 2001 Jun;18(6):1034-44.
- de Andrade Rosa I, Einicker-Lamas M, Roney Bernardo R, Previatto LM, Mohana-Borges R, Morgado-Díaz JA, Benchimol M. (2006) Cardiolipin in hydrogenosomes: evidence of symbiotic origin. *Eukaryot Cell*. 2006 Apr;5(4):784-7.
- Dolezal P, Dancis A, Lesuisse E, Sutak R, Hrdý I, Embley TM, Tachezy J. (2007) Frataxin, a conserved mitochondrial protein, in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell*. 2007 Aug;6(8):1431-8.
- Dolezal P, Smíd O, Rada P, Zubáková Z, Bursac D, Suták R, Nebesárová J, Lithgow T, Tachezy J. (2005) Giardia mitochondria and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):10924-9.
- Dyall SD, Koehler CM, Delgadillo-Correa MG, Bradley PJ, Plümper E, Leuenberger D, Turck CW, Johnson PJ. (2000) Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol Cell Biol*. 2000 Apr;20(7):2488-97.

- Fenchel, T.; Bernard, C.; Esteban, G.; Finlay, B.J.; Hansen, P.J.; Iversen, N. (1995). Microbial diversity and activity in a Danish fjord with anoxic deep water. *Ophelia* 43(1): 45-100
- Hackstein JH, Akhmanova A, Voncken F, van Hoek A, van Alen T, Boxma B, Moon-van der Staay SY, van der Staay G, Leunissen J, Huynen M, Rosenberg J, Veenhuis M. (2001) Hydrogenosomes: convergent adaptations of mitochondria to anaerobic environments. *Zoology (Jena)*. 2001;104(3-4):290-302.
- Hampel V, Simpson GB (2008) Possible Mitochondria-Related Organelles in Poorly-Studied “Amitochondriate” Eukaryotes. V Hydrogenosomes and mitosomes: Mitochondria of anaerobic eukaryotes (Tachezy J, Ed.). Série: Microbiology monographs, Springer, Heidelberg, 2008
- Hampel V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AG, Roger AJ. (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 10;106(10):3859-64.
- Hampel V, Silberman JD, Stechmann A, Diaz-Triviño S, Johnson PJ, Roger AJ. (2008) Genetic Evidence for a Mitochondriate Ancestry in the ‘Amitochondriate’ Flagellate *Trimastix pyriformis*. *PLoS ONE* 3(1): e1383. doi:10.1371/journal.pone.0001383
- Henze K, Horner DS, Suguri S, Moore DV, Sánchez LB, Müller M, Embley TM. (2001) Unique phylogenetic relationships of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes *Giardia intestinalis*, *Spironucleus barkhanus* and *Trichomonas vaginalis*. *Gene*. 2001 Dec 27;281(1-2):123-31.
- Horner DS, Embley TM. (2001) Chaperonin 60 phylogeny provides further evidence for secondary loss of mitochondria among putative early-branching eukaryotes. *Mol Biol Evol*. 2001 Oct;18(10):1970-5
- Hrdy I, Hirt RP, Dolezal P, Bardonová L, Foster PG, Tachezy J, Embley TM. (2004) *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature*. 2004 Dec 2;432(7017):618-22.
- Hrdy I, Tachezy J, Muller M, (2008) Metabolism of trichomonad hydrogenosomes. V Hydrogenosomes and mitosomes: Mitochondria of anaerobic eukaryotes (Tachezy J, Ed.). Série: Microbiology monographs, Springer, Heidelberg, 2008
- Lara E, Chatzinotas A, Simpson AG. (2006) *Andalucia* (n. gen.)--the deepest branch within jakobids (Jakobida; Excavata), based on morphological and molecular study of a new flagellate from soil. *J Eukaryot Microbiol*. 2006 Mar-Apr;53(2):112-20.
- Nikolaev SI, Berney C, Fahrni JF, Bolivar I, Polet S, Mylnikov AP, Aleshin VV, Petrov NB, Pawlowski J. (2004) The twilight of Heliozoa and rise of Rhizaria, an emerging supergroup of amoeboid eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 25;101(21):8066-71.
- O’Kelly, C. J. (1993) The jakobid flagellates: structural features of *Jakoba*, *Reclinomonas* and *Histiona* and implications for the early diversification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40: 627--636.
- O’Kelly CJ, Farmer MA, Nerad TA. (1999) Ultrastructure of *Trimastix pyriformis* (Klebs) Bernard et al.: similarities of *Trimastix* species with retortamonad and jakobid flagellates. *Protist*. 1999 Aug;150(2):149-62.
- O’Kelly CJ, Silberman JD, Amaral Zettler LA, Nerad TA, Sogin ML. (2003) *Monopylocystis visvesvarai* n. gen., n. sp. and *Sawyeria marylandensis* n. gen., n. sp.: two new amitochondrial heterolobosean amoebae from anoxic environments. *Protist*. 2003 Jul;154(2):281-90.
- Park JS, Simpson AG, Lee WJ, Cho BC. (2007) Ultrastructure and phylogenetic placement within Heterolobosea of the previously unclassified, extremely halophilic heterotrophic flagellate *Pleurostomum flabellatum* (Ruinen 1938). *Protist*. 2007 Jul;158(3):397-413. Epub 2007 Jun 18.
- Regoes A, Zourmpanou D, León-Avila G, van der Giezen M, Tovar J, Hehl AB. (2005) Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J Biol Chem*. 2005 Aug 26;280(34):30557-63.

- Roger AJ, Svärd SG, Tovar J, Clark CG, Smith MW, Gillin FD, Sogin ML. (1998) A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6;95(1):229-34.
- Rotte C, Stejskal F, Zhu G, Keithly JS, Martin W. (2001) Pyruvate : NADP⁺ oxidoreductase from the mitochondrion of *Euglena gracilis* and from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*: a biochemical relic linking pyruvate metabolism in mitochondriate and amitochondriate protists. *Mol Biol Evol*. 2001 May;18(5):710-20.
- Silberman JD, Simpson AG, Kulda J, Cepicka I, Hampl V, Johnson PJ, Roger AJ. (2002) Retortamonad flagellates are closely related to diplomonads--implications for the history of mitochondrial function in eukaryote evolution. *Mol Biol Evol*. 2002 May;19(5):777-86.
- Simpson, A. G B., C. Bernard, and D. J. Patterson. (2000). The ultrastructure of *Trimastix marina* Kent, 1880 (Eukaryota), an excavate flagellate. *Europ. J. Protistol*. 36:229–252.
- Simpson AG, Radek R, Dacks JB, O'Kelly CJ. (2002) How oxymonads lost their groove: an ultrastructural comparison of *Monocercomonoides* and excavate taxa. *J Eukaryot Microbiol*. 2002 May-Jun;49(3):239-48.
- Simpson GB (2003) Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003 Nov;53(Pt 6):1759-77.
- Simpson AG, Patterson DJ. (1999) The ultrastructure of *Carpediemonas membranifera* (Eukaryota) with reference to the excavate hypothesis. *Europ. J. Protistol*. 35:353–370.
- Simpson AG, Patterson DJ. (2001) On core jakobids and excavate taxa: the ultrastructure of *Jakoba incarcerata*. *J. Eukaryot. Microbiol*. 48:480–492.
- Simpson AG, Roger AJ, Silberman JD, Leipe DD, Edgecomb VP, Jermini LS, Patterson DJ, Sogin ML. (2002) Evolutionary history of "early-diverging" eukaryotes: the excavate taxon *Carpediemonas* is a close relative of *Giardia*. *Mol Biol Evol*. 2002 Oct;19(10):1782-91.
- Simpson AGB, Hoff J, Bernard C, Burton HR, Patterson DJ (1996) The ultrastructure and systematic position of the Euglenozoon *Postgaardi mariagerensis*, Fehchel et al. *Arch Protistenkd* 1996, 147:213-225.
- Smirnov AV, Fenchel T (1996) *Vahlkampfia anaerobica* n. sp. and *Vannella peregrina* n. sp. (Rhizopoda) - Anaerobic Amoeboae from a Marine Sediment. *Arch. Protistenk* 147:189-198,
- Sterud E, Poynton SL. (2002) *Spironucleus vortens* (Diplomonadida) in the Ide, *Leuciscus idus* (L.) (Cyprinidae): a warm water hexamitid flagellate found in northern Europe. *J Eukaryot Microbiol*. 2002 Mar-Apr;49(2):137-45.
- Sutak R, Dolezal P, Fiumera HL, Hrdy I, Dancis A, Delgadillo-Correa M, Johnson PJ, Müller M, Tachezy J. (2004) Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 13;101(28):10368-73
- Tachezy J, Sánchez LB, Müller M. (2001) Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol Biol Evol*. 2001 Oct;18(10):1919-28.
- Tjaden J, Haferkamp I, Boxma B, Tielens AG, Huynen M, Hackstein JH. (2004) A divergent ADP/ATP carrier in the hydrogenosomes of *Trichomonas gallinae* argues for an independent origin of these organelles. *Mol Microbiol*. 2004 Mar;51(5):1439-46.
- Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. 2003 Nov 13;426(6963):172-6

- Weerakoon ND, Harper JD, Simpson GB, Patterson DJ (1999) Centrin in the groove: immunolocalisation of centrin and microtubules in the putatively primitive protist *Chilomastix cuspidata* (Retortamonadida). *Protoplasma* 210:75-84
- Yubuki N, Inagaki Y, Nakayama T, Inouye I. (2007) Ultrastructure and ribosomal RNA phylogeny of the free-living heterotrophic flagellate *Dysnectes brevis* n. gen., n. sp., a new member of the Fornicata. *J Eukaryot Microbiol.* 2007 Mar-Apr;54(2):191-200.
- Yubuki N, Edgcomb VP, Bernhard JM, Leander BS. (2009) Ultrastructure and molecular phylogeny of *Calkinsia aureus*: cellular identity of a novel clade of deep-sea euglenozoans with epibiotic bacteria. *BMC Microbiol.* 2009 Jan 27;9:16.